

## · 基础研究 ·

## 大鼠腰、颈段脊髓神经元间联系的 c-fos 基因研究 \*

张敬东<sup>1</sup> 张 新<sup>2</sup> 袁绍辉<sup>2</sup> 俞 兴<sup>3</sup> 徐 林<sup>3</sup>

**摘要 目的:**应用 c-fos 基因研究腰段和颈段脊髓神经元之间的联系。**方法:**成年雄性 SD 大鼠 20 只, 钳夹左侧坐骨神经, 灌注取材后行 c-fos 免疫组化染色。**结果:**在腰段 L4-6 脊髓中, 钳夹诱发的 c-fos 基因表达均在钳夹同侧脊髓灰质内, 脊髓灰质前角神经元和后角神经元中的 c-fos 基因表达明显增多, 对照侧右侧脊髓中的神经元 c-fos 基因未见明显表达。在颈段 C5-8 脊髓中, 双侧脊髓灰质前角中可见 c-fos 基因表达明显增多, 双侧脊髓灰质后角中未见明显 c-fos 基因表达。**结论:**颈段脊髓和腰段脊髓神经元之间存在着神经纤维联系。

**关键词** 坐骨神经; c-fos 基因; 脊髓; 神经元

**中图分类号:** R49, R651.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2006)-07-0588-02

**A c-fos labeling study on the neuronal pathway connection between the cervical spinal cord and the lumbar spinal cord/ZHANG Jingdong, ZHANG Xin, YUAN Shaohui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(7):588-589**

**Abstract Objective:** To investigate the neuronal pathway connection between the cervical spinal cord and the lumbar spinal cord with c-fos labeling. **Method:** 20 male SD rats were operated to expose and grind the left sciatic nerve with forceps. The cervical and lumbar spinal cord was taken out 2 hours after the operation. Then the immunochemical labeling of the c-fos was done. **Result:** The anterior corner cell and posterior corner cell with c-fos labeling were found in the left lumbar spinal cord (L4-6), and it was found in the anterior corner of the two side cervical spinal cord (C5-8) too. **Conclusion:** There is neural pathway connection between the cervical spinal cord and the lumbar spinal cord.

**Author's address** Department of Orthopaedics, 208 Hospital, PLA, Changchun, 130062

**Key words** sciatic nerve; c-fos gene; spinal cord; neuron

1978 年 Fasano 采用电刺激法进行选择性感神经后根切断术(selective posterior rhizotomy, SPR)。国内自 1991 年开始许多学者采用 SPR 治疗脑瘫肢体痉挛, 疗效满意<sup>[1-6]</sup>。其手术机制在于通过电刺激选择切断肌梭传入的 Ia 类纤维, 阻断脊髓反射中的  $\gamma$ -环路, 降低过强的肌张力, 从而解除肢体的痉挛。然而用单一  $\gamma$ -环路理论不能解释 SPR 手术后上肢痉挛的缓解和流涎、斜视、语言障碍的好转等现象。本研究拟应用 c-fos 基因研究腰段脊髓神经元和颈段脊髓神经元之间是否存在神经纤维联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与手术方法

雄性成年 SD 大鼠 20 只, 体重 220—250g。麻醉: 1% 乌拉坦 3ml 腹腔内注射麻醉。暴露并钳夹左侧坐骨神经: 于大鼠膝上做平行于股骨的后侧皮肤切口, 长约 2cm。找到坐骨神经并和周围软组织分离, 暴露坐骨神经长度约 1cm。从坐骨神经远侧端开始, 用止血钳依次向近侧端钳夹, 止血钳每次均咬合 4 扣, 以保证神经不断裂及刺激强度相同。右侧坐骨神经作为对照侧, 只暴露坐骨神经, 不进行钳夹。

### 1.2 灌注取材

①灌注时间: 钳夹左侧坐骨神经后 2h。②灌注步骤: 灌注压为 100cmH<sub>2</sub>O。先用 Maste rflexi 灌注泵快速灌注生理盐水 100ml(室温), 再灌注固定液 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 250ml 约 1ml/g (快速灌注 100ml, 见动物四肢、尾和头部剧烈抽动数秒后, 全身肌肉细颤, 随后缓慢灌注 30min), 灌注结束后, 动物躯干及四肢僵硬。③取材: 灌注后, 取出脊髓。在相同的固定液中固定 24h。④脱水: 组织转到含 30% 蔗糖的 0.1M PBS(磷酸盐缓冲液)中, 在 4℃ 条件下脱水 24h。⑤切片: 将颈髓 5—8 节段, 腰髓 4—6 节段(根据脊髓剥离标本的神经根进行定位) 进行冰冻连续切片, 片厚 40 $\mu$ m, 隔 2 片留 1 片。

### 1.3 c-fos 免疫组化反应

(1) 冰冻切片浸入蒸馏水冲洗。(2) PBS 浸泡 5min。(3) 滴加封闭用正常羊血清工作液, 室温 15min。(4) 滴加 1:400 稀释的 I 抗(SP9003), 4℃ 条件下孵育 48h。(5) PBS 冲洗 3 次, 每次 3min。(6) 滴加

\*基金项目: 本课题为吉林省科委资助课题(20030509)

1 解放军第二零八医院骨科, 长春, 130062

2 吉林大学第一医院骨科

3 北京中医药大学东直门医院骨科

作者简介: 张敬东, 男, 主治医师, 博士

收稿日期: 2005-09-01

生物素化Ⅱ抗工作液, 4℃条件下孵育 12h。(7)重复步骤(5)。(8)滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温 15min。(9)重复步骤(5)。(10)DAB(二氨基联苯胺)示踪显色。(11)重复步骤(5)。(12)自然风干。(13)酒精梯度脱水, 封片。(14)镜下观察。

#### 1.4 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用  $t$  检验比较实验侧和对照侧结果。

## 2 结果

20 只成年雄性 SD 大鼠均可见 c-fos 基因表达。c-fos 基因阳性表达细胞为细胞核深染细胞。在腰段 L4-6 脊髓中, 钳夹诱发的 c-fos 基因表达均在钳夹同侧脊髓灰质内, 在脊髓前角神经元和后角神经元中可见大量 c-fos 基因表达, 在脊髓后角其分布主要集中在脊髓后角 I—II 层, 对照侧右侧脊髓中的神经元 c-fos 基因未见明显表达(图 1—3, 见后置彩色插页 1)。

SD 大鼠腰段脊髓灰质中 c-fos 阳性反应细胞计数镜下计数统计结果为: 实验侧后角  $36 \pm 3$  (个/HP)、前角  $14 \pm 2$  (个/HP); 对照侧后角  $9 \pm 2$  (个/HP)、前角  $2 \pm 1$  (个/HP)。左侧腰段脊髓灰质前、后角和右侧比较  $P < 0.01$ 。

颈段 C5—8 脊髓, 双侧脊髓灰质前角中可见 c-fos 基因表达明显增多, 双侧脊髓灰质后角中未见明显 c-fos 基因表达(图 4—5, 见后置彩色插页 1)。

## 3 讨论

原癌基因广泛存在于真核细胞基因组内<sup>[7]</sup>, 在原癌基因家族中, 有一类对多种外界刺激在数分钟内就可作出反应, 并进行一过性表达的基因被称为即刻早期基因, c-fos 基因就是其中之一。其转录所产生的成熟 mRNA 编码的核磷蛋白, 简称 Fos, Fos 蛋白存在于神经细胞核内, 可通过免疫化学方法显示。1987 年 Hunt 等<sup>[8]</sup>率先证实, 伤害性刺激可诱导大鼠脊髓背角产生大量 Fos 蛋白。目前学者们已把 Fos 蛋白作为伤害性信息传递通路上各级中枢神经元被激活的一种标志加以观察和研究。本实验就是利用 c-fos 基因这一长距离示踪特点, 来研究腰段脊髓神经元和颈段脊髓神经元之间是否存在神经纤维联系, 以解释 SPR 术后上肢肌张力下降的临床现象。

实验中, 钳夹左侧坐骨神经 2h 后, 钳夹左侧坐骨神经诱发细胞表达的 Fos 蛋白均在钳夹同侧脊髓灰质内, 后角神经元中的 Fos 蛋白明显增多, 对照侧右侧脊髓灰质中的神经元 Fos 蛋白未见明显表达,

两侧对比具有显著性差异。在脊髓后角其分布主要集中在脊髓后角 I—II 层, 这与有关实验吻合<sup>[8-11]</sup>。

以往的研究中, 在给予伤害性刺激 2h 后, Fos 蛋白主要分布于同侧脊髓后角 I、II 层的内侧部, 少数位于背角深层, 而位于脊髓前角的 Fos 蛋白很少; 本实验脊髓前角中 Fos 蛋白表达数量与以往研究有明显的差别。以往实验的各种刺激条件均为刺激感觉神经末梢, 而本实验钳夹坐骨神经时不但刺激坐骨神经中的感觉神经纤维, 亦刺激运动神经纤维, 运动神经纤维的兴奋引起脊髓灰质前角 Fos 蛋白表达的明显增多。故刺激坐骨神经可引起腰段脊髓前角运动细胞表达 Fos 蛋白。

在颈段 C5—8 脊髓中, 双侧脊髓灰质前角中可见 Fos 蛋白明显增多, 双侧脊髓灰质后角中未见明显 Fos 蛋白表达。这种实验结果文献未见报道, 为什么刺激坐骨神经后, 颈段脊髓灰质前角会出现 Fos 蛋白明显增多呢? 根据神经解剖学知识我们作出以下推论: 网状结构是肌紧张的整合中心, SPR 手术切断  $\gamma$ -环路后, 网状结构易化区接受从脊髓上行感觉通路侧支传来的冲动减少, 从而使支配下肢的网状结构易化区兴奋性下降, 这种兴奋性下降通过细胞的电兴奋或中间神经元, 使邻近区域支配上肢的网状结构易化区兴奋性也下降, 这种兴奋性下降通过网状脊髓束到达颈段脊髓支配上肢的运动神经元, 使上肢的肌紧张下降。对于这一推论, 还有待进一步的实验证实。

## 参考文献

- [1] Xu Lin. Hypselective posterior rhizotomy in treatment of spasticity of paralytic limbs [J]. Chinese Medical Journal, 1993, 160(9): 671.
- [2] 俞兴. 选择性脊神经后根切断术治疗儿童痉挛型脑瘫进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(1): 104.
- [3] 李燕春. 小儿脑性瘫痪的早期诊断与早期治疗[J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(9): 461.
- [4] 徐林, 刘小林, 俞兴. 第三届脑瘫外科与康复研讨会纪要[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 10(14): 1357.
- [5] 陈四文, 邓吉华, 汪受传. 小儿脑性瘫痪的国内研究现状[J]. 中国康复, 2002, 17(4): 241.
- [6] 王辉. 脑瘫研究现状[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(5): 289.
- [7] 韩济生主编. 神经科学纲要[M]. 第 1 版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 273—285.
- [8] Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation [J]. Nature, 1987, 328(13): 632.
- [9] Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat [J]. J Comp Neurol, 1990, 296(4): 517.
- [10] Herdegen T, Rudiger S, Mayer B. Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun Fos and krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw[J]. Mol Brain Res, 1994, 22(1): 245.
- [11] Honore P, Buritova J, Besson JM. Carrageenin evoked c-fos expression in rat lumbar spinal cord: the effects of indomethacin [J]. Eur J Pharmacol, 1995, 272: 249.